

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, C07K 14/025 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 97/46693 |
| | | (43) Date de publication internationale: 11 décembre 1997 (11.12.97) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00962 (22) Date de dépôt international: 3 juin 1997 (03.06.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/07174 4 juin 1996 (04.06.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): BLOCH, Marie-Aline [FR/FR]; 134, rue Edmond Locard, F-69005 Lyon (FR). (74) Mandataire: AYROLES, Marie-Pauline; Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins, Direction de la Propriété Intellectuelle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). | | (81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues. |
| (54) Title: VIRUS-LIKE PARTICLES USEFUL AS A VECTOR FOR DELIVERING NUCLEIC ACID | | |
| (54) Titre: PSEUDO-PARTICULES VIRALES UTILES EN TANT QUE VECTEUR DE DELIVRANCE D'ACIDE NUCLEIQUE | | |
| (57) Abstract | | |
| <p>The invention discloses a non-infectious virus-like particle (VLP) comprising (i) a capsid defining an internal space and constituted at least by all or part of the L1 protein and optionally all or part of the E2 protein of a papillomavirus, and, (ii) a nucleic acid molecule contained in the said internal space; the nucleic acid molecule comprising a region coding for a protein of interest, in particular an antigen or a cytokin. Such VLP's can be administered <i>in vivo</i> and are particularly useful for vaccinal purposes in therapy or for prevention against all kinds of cancerous conditions or infections.</p> | | |
| (57) Abrégé | | |
| <p>L'invention a pour objet une pseudo-particule virale (VLP) non-infectieuse qui comprend (i) une capside délimitant un espace interne et constituée au moins par tout ou partie de la protéine L1 et éventuellement tout ou partie de la protéine E2 d'un papillomavirus, et (ii) une molécule d'acide nucléique contenue dans ledit espace interne; la molécule d'acide nucléique comportant une région codant pour une protéine d'intérêt, notamment un antigène ou une cytokine. De telles VLPs peuvent être administrées <i>in vivo</i> et sont notamment utiles à des fins vaccinales en thérapie ou en prévention à l'encontre de toutes espèces d'infections ou d'états cancéreux.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|-----------------------------------------------|----|------------------------------------------|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brsil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroon | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakhstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 1 -

Pseudoparticules virales utiles en tant que vecteur de délivrance d'acide nucléique

L'invention a pour objet de nouveaux vecteurs de délivrance de matériel génétique pour usage *i.a.* en thérapie génique, en immunothérapie ou à titre de vaccin
5 thérapeutique ou prophylactique.

Chez un vertébré, le transfert de matériel génétique, quel que soit son utilité finale, peut être réalisé selon divers modes opératoires qui, pour les plus connus, sont (i) le transfert par vecteurs viraux, (ii) le transfert *via* une encapsulation dans des
10 liposomes ou équivalents, (iii) le transfert médié par des agents facilitants tels que les lipides cationiques, les billes d'or ou le phosphate de calcium et (iv) le transfert par simple injection d'ADN nu, c'est-à-dire dépourvu de tout autre élément pouvant entrer en interaction ou en coopération avec l'ADN afin d'en promouvoir le transfert.

15 Chaque méthode est d'application générale ; cependant, une méthode plutôt qu'une autre peut apparaître plus appropriée en fonction de divers facteurs, tels que le type de matériel à transférer, le lieu où l'expression de ce matériel est recherchée, la permanence ou le caractère transitoire de l'expression.

20 Par exemple, si il s'agit de corriger une déficience génétique chez un individu, on peut songer à préférer un mode de transfert intégratif mettant en jeu des vecteurs viraux dérivés des rétrovirus.

Dans d'autres cas, par exemple dans le traitement des cancers, on favorisera une
25 expression transitoire et ciblée au lieu de la tumeur. A cette fin, des vecteurs viraux tels que les vecteurs vaccine sont particulièrement appropriés.

Pour ce qui est des traitements vaccinaux, les vecteurs vaccine, les liposomes ou même l'ADN nu peuvent convenir. Ces derniers seront préférés aux vecteurs
30 rétroviraux, en particulier pour la vaccination préventive.

On a maintenant découvert que les capsides des papillomavirus peuvent être reconstituées *in vitro* en présence d'ADN ou d'ARN hétérologue, et que ce matériel
génétique s'y trouvait efficacement encapsulé. Ainsi les capsides, communément
35 appelées VLPs pour virus-like particles, peuvent servir à titre de véhicule de transfert de matériel génétique, avec des applications diverses.

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 2 -

Les papillomavirus sont de petits virus à ADN, non-enveloppés de structure icosaédrique. Leur génome code pour jusqu'à huit protéines précoces et deux protéines tardives. Les cadres de lecture ouverts sont répertoriés de E1 à E7 sans oublier L1 et L2. Les gènes précoces (E pour early) sont associés aux fonctions de réplication virale et de transformation cellulaire. Les capsides des papillomavirus sont constituées des deux protéines L₁ et L₂ (L pour late proteins ou protéines tardives) ; L₁ étant le constituant majeur. Une information détaillée peut être trouvée dans Virology, Second Ed. by B.N. Fields, Raven Press (1990).

Des VLPs imitant en tout point les capsides des virions natifs peuvent être obtenus par expression recombinante soit de L₁ seulement, soit de L₁ + L₂, dans le système vaccine (Hagensee et al, J. Virol. (1993) 67 : 315) ou dans le système baculovirus (Kirnbauer et al, PNAS (1992) 89 : 12180 ; Kirnbauer et al, J. Virol. (1993) 67 : 6929 ; Rose et al, J. Virol. (1993) 67 : 1936 ; Le Cann et al, FEMS Microbiol. Lett. (1994) 117 : 269).

Dans la mesure où ces VLPs adoptent une conformation native et réagissent avec des anticorps neutralisants connus pour reconnaître des épitopes conformationnels présents chez les virions natifs, il a déjà été suggéré d'utiliser ces VLPs en tant que vaccin à l'encontre des infections à papillomavirus (WO 94/5792).

De nombreuses espèces animales, y compris les humains sont sujettes à des infections à papillomavirus. Ces agents infectieux sont spécifiques du groupe qu'ils infectent. Ainsi on distingue entre autres, les papillomavirus bovins et les papillomavirus humains (HPV). Chez les humains, différents types d'HPV sont à l'origine de maladies diverses. Les types 1, 2, 3, 4, 7, 10, et 26 - 29 sont la cause de verrues bénignes. Les types 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19 - 25, 36, et 46 - 50 peuvent induire des lésions chez les individus déficients du point de vue immunologique. Les types 6, 11, 34, 39, 41 - 44 et 51 - 55 sont responsables des dysplasies ou des condylomes non malins des muqueuses génitale et respiratoire ; dans de rares cas, certains de ces types peuvent se retrouver dans des carcinomes invasifs. Enfin les types 16 et 18 et dans une moindre mesure 31, 33, 35 et 45, provoquent des dysplasies épithéliales de la muqueuse génitale et sont très largement associés à la majorité des carcinomes invasifs.

La présente invention propose quant à elle, des pseudo-particules virales (VLPs) de papillomavirus non-infectieuses qui comprennent une capside délimitant un espace interne et une molécule d'acide nucléique contenu dans cet espace interne ; la molécule

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 3 -

d'acide nucléique étant différente du génome d'un papillomavirus au moins en ce qu'elle est dépourvue de tout ou partie des régions dudit génome codant pour les protéines tardives de type sauvage.

- 5 Aux fins de la présente invention, la capside est principalement formée par tout ou partie d'une protéine L1 ou par tout ou partie d'une protéine L1 et tout ou partie d'une protéine L2. Par souci de simplicité, on se bornera dans la suite du texte à ne parler que de protéine L1 ou L2 pour désigner les protéines entières ainsi que leurs fragments. On peut aussi prévoir qu'il y aura plusieurs protéines L1 ou L2, provenant de
- 10 types différents.

Parmi les types de HPV dont peuvent être issues les protéines L1 et L2, on cite notamment les types 1, 6, 10, 11, 16, 18, 31, 33, 35 ou 45.

- 15 Lorsque les protéines proviennent d'un HPV-16, -18, -33 ou 35 ou de tout autre HPV pouvant induire un carcinome invasif, il est préférable que la séquence de la protéine L1 en usage aux fins de l'invention soit identique à celle de la protéine L1 qui est présente chez le papillomavirus lorsque ce dernier est initialement isolé à partir d'une lésion bénigne (e.g. condyloma acuminatum ou dysplasie cervicale). En effet, il
- 20 semble bien qu'au stade d'une lésion bénigne, le papillomavirus puisse toujours se répliquer librement à l'état de virion complet ; tandis qu'au stade malin, le virus aurait cette fonction altérée en raison notamment d'une mutation qui serait intervenue au niveau de l'ORF codant pour L1. Cette mutation empêcherait entre autre la formation des capsides. La séquence d'une protéine L1 de type 16 provenant d'un HPV isolé à
- 25 partir d'un condylome est divulguée dans l'identificateur de séquence n° 2 de la demande WO 94/5792. On note que cette séquence se distingue de celle d'une protéine L1 d'un HPV-16 isolé d'un carcinome malin, en ce que l'acide aminé en position 202 est un acide aminé autre que l'histidine i.e. un résidu acide aspartique ou acide glutamique.

- 30 En ce qui concerne la protéine L2, celle-ci peut être éventuellement déléetée de son site de liaison à l'ADN, afin de favoriser l'élimination de toute trace d'ADN lors de la purification des éléments nécessaires à la mise en oeuvre des VLPs selon l'invention. En pratique, il s'agit de supprimer ou de modifier un ou plusieurs des 12 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale. De telles protéines L2 sont notamment décrites dans
- 35 WO 95/20659 et Zhou et al, J. Virol. (1994) 68 : 619.

De manière alternative, la capside peut être constituée par une ou des protéines hybrides (protéines de fusion) correspondant à des chimères L1 - E6, L1 - E7, L2 - E6,

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 4 -

L2 - E7 ou à toute autre forme de chimère dans laquelle on retrouverait au moins une partie d'une protéine L1 ou L2 associé à un peptide ou polypeptide hétérologue à L1 ou L2, par exemple un peptide gag du HIV (human immunodeficiency virus). Afin de former de tels hybrides, plusieurs types d'association sont en théorie possibles.

5

Par exemple, on peut prévoir d'associer par liaison peptidique l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la protéine entière L1 et L2 avec l'extrémité inverse de la protéine E6 ou E7. On peut prévoir d'agir de même avec des protéines tronquées. Toujours par liaison peptidique, on peut aussi prévoir d'insérer au coeur de la séquence de la protéine L1 ou L2, tout ou partie de E6 ou E7 ; de préférence on insérera des fragments de E6 ou E7 correspondant à des épitopes remarquables. L'insertion dans la séquence de la protéine L1 ou L2 pourra s'effectuer en conservant l'intégralité de la séquence L1 ou L2 ou bien en en déléant une certaine partie. Bien évidemment, la construction de cassette d'expression appropriées (par fusion génétique) codant pour ces protéines hybrides présidera à l'obtention de ces protéines.

Ainsi que précédemment évoqué, le ou les éléments constituant la capsidé peuvent être produits dans des systèmes recombinants, bactéries, levure, cellule de mammifères ou d'insectes. Par exemple, WO 95/31476 traite de l'expression et de la purification d'une protéine L1 dans et à partir d'*E. coli*. L'expression et la purification dans et à partir de la levure, des protéines L1 de HPV-6a, -11, -16 and -18 est décrite dans WO 95/31532, ainsi que la co-expression et la co-purification de ces mêmes protéines avec les protéines L2 correspondantes. L'expression de la protéine L1 ou des protéines L1 et L2 de type 16, dans des cellules de mammifères, à l'aide d'un vecteur vaccine, est décrite dans WO 93/2184 et Zhou et al, Virology (1991) 185 : 251. L'expression de la protéine L1 de type 1, dans des cellules de mammifères COS, à l'aide du plasmide pSVL est décrite dans WO 94/152 et Ghim et al, Virology (1992) 190 : 548. L'expression de la protéine L1 de type 1, grâce au système vaccine, est aussi divulguée par Hagensee et al, J. Virol. (1993) 67 : 315. L'expression de la protéine L1 de type 16 et sa co-expression avec la protéine L2 correspondante, dans des cellules d'insectes, à l'aide d'un baculovirus, est décrite dans WO 94/5792 et Kirnbauer et al, J. Virol. (1993) 67 : 6929. Sur le même sujet on cite aussi Xi et al, J. Gen. Virol. (1991) 72 : 2981. L'expression de la protéine L1 de type 11, 16 et 18, dans le même système, est reportée par WO 94/20137 et Rose et al, J. Virol. (1993) 67 : 1936. Ainsi la mise au point d'un système recombinant destiné à l'expression d'une protéine L1 ou des protéines L1 et L2 est clairement à la portée de l'homme de l'art.

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 5 -

Lorsque ces protéines sont produites dans un système procaryote, elles restent généralement à l'état dissocié après purification. Il n'y a pas formation de VLPs sauf si on soumet ces protéines à un traitement spécifique de renaturation et même dans ce cas là, le rendement reste très faible.

5

Lorsque ces protéines sont exprimées dans un système eucaryote, on s'attend généralement à ce que les protéines produites se réassemblent spontanément sous forme de VLPs, sauf par exemple si le taux d'expression était trop faible. Par conséquent le produit que l'on obtient après purification est bien des VLPs et non des protéines dissociées.

10

Afin de mettre en oeuvre l'objet de la présente invention, il convient donc de traiter les VLPs produites en système eucaryote, de manière à les dissocier en ses éléments. La dissociation requiert que l'on réduise les ponts disulphures et que l'on supprime les ions calcium (Volpers et al, J. Virol. (1995) 69 : 3258 et Colomar et al, J. Virol. (1993) 67 : 2779). Par exemple on placera les VLPs en pH alcalin ou on utilisera un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT). On utilisera aussi un agent chélateur complexant le calcium comme l'EGTA (ethylene glycol-bis (bêta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid).

20

Aux fins de la présente invention, l'acide nucléique encapsulé peut être de l'ARN ou de l'ADN ; ce dernier sera avant tout préféré. La taille de la molécule n'est pas critique ; on indique toutefois qu'il est préférable qu'elle n'excède pas plus de 8 kbp, du moins en ce qui concerne l'ADN.

25

Une molécule d'acide nucléique utile aux fins de la présente invention doit être différente du génome de papillomavirus, bien qu'elle puisse en contenir certains éléments. En particulier cette molécule n'a pas la structure d'un génome de papillomavirus et ne contient pas d'origine de répllication spécifique d'un papillomavirus.

30

L'ADN peut être sous forme linéaire ou circulaire ; cette dernière forme étant préférée. Avantageusement il s'agira d'un plasmide. Celui-ci sera intégratif ou pas, selon le but recherché. De même, il pourra ou non se répliquer dans une cellule de mammifère. A des fins de production, il comportera une origine de répllication e.g. procaryote.

35

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 6 -

La molécule d'ADN e.g. le plasmide, peut éventuellement comporter un site qui lui permette de se lier à la protéine E2 d'un papillomavirus. Un tel site peut avoir pour séquence la formule ACCN₆MT dans laquelle N est indépendamment A, G, C ou T et M est G ou T. La molécule d'ADN peut aussi comporter tout ou partie de la longue
5 région de contrôle (LCR) du génome d'un papillomavirus.

La finalité essentielle de cette molécule d'ADN (ou d'ARN) est de permettre l'expression d'une ou de plusieurs peptides, polypeptides ou protéines d'intérêt dans une cellule de mammifère. En conséquence, elle comporte une région codante placée sous le
10 contrôle d'un promoteur approprié. A titre d'exemple, on cite le promoteur précoce du cytomégalovirus humain notamment décrit dans le brevet américain USP 5 168 062 ou un promoteur tissu-spécifique tel que le promoteur du gène codant pour la desmine humaine (Li et al, Gène (1989) 78 : 243 et Li et al, Development (1993) 117 : 947).

15 Le choix de la région codante sera déterminé par l'usage auquel les VLPs selon l'invention seront destinées. Ainsi on peut utiliser ces VLPs comme agent de vaccination à l'encontre des infections parasitaires, bactériennes ou virales. Dans ce cas, le peptide ou polypeptide ou la protéine sera sélectionnée parmi les antigènes parasitaires, bactériens ou viraux.

20 Selon un mode de réalisation particulier, on choisit d'utiliser les VLPs selon l'invention à titre d'agent de vaccination thérapeutique ou préventif, à l'encontre des infections à papillomavirus. Pour ce faire, le ou les peptide(s), polypeptide(s) ou protéine(s) codé(s) sera (seront) avantageusement sélectionné(s) parmi tout ou partie
25 des protéines E1 et E2 et des formes non-oncogéniques des protéines E6 et E7 d'un papillomavirus ; préférentiellement d'un HPV de type 16, 18, 31, 33, 35 ou 45. Ce papillomavirus peut être éventuellement d'un type différent de celui dont est (sont) issue(s) la ou les protéine(s) de capside.

30 Les formes non-oncogéniques incluent les protéines E6 et E7 d'un papillomavirus non-oncogène ainsi que les formes délétées d'une protéine E6 ou E7 d'un papillomavirus oncogène. avantageusement, une telle forme délétée d'une protéine E6 ne comporte pas tout ou partie de la région de E6 comprise entre les résidus acide aminé 106 et 115 (par exemple, il peut s'agir d'une protéine HPV-16 E6 Δ (106-110) ou Δ
35 (111-115) ou Δ (106-115)). De même, une forme délétée d'une protéine E7 ne comporte pas tout ou partie de la région de E7 comprise entre les résidus acide aminé 20 et 26 (par exemple, il peut s'agir d'une protéine HPV-16 E7 Δ (21-24) ou Δ (21-26)).

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 7 -

Ces protéines précoces, leur fragment d'ADN correspondant ainsi que leur forme non-oncogénique sont décrites dans Crook et al, Cell (1991) 67 : 547 et Munger et al, EMBO J. (1988) 8 : 4099.

- 5 A titre d'exemple, on présente ci-après diverses combinaisons possibles en ce qui concerne l'origine des protéines (présentation non-exhaustive) :

| | Capside | | Acide nucléique | |
|----|---------------------|--------|---------------------|---------------------|
| | L1 | L2 | E6 | E7 |
| 10 | HPV-16 | HPV-16 | HPV-16 | HPV-16 |
| | HPV-16 | HPV-16 | HPV-18 | HPV-18 |
| 15 | HPV-16 et HPV-18 | HPV-16 | HPV-16 et HPV-18 | HPV-18 et HPV-18 |
| | HPV-16 et HPV-18 | --- | HPV-33 | --- |
| 20 | HPV-16 | --- | HPV-16 | --- |
| | HPV-16 | --- | --- | HPV-16 |

- 25 Sous un autre aspect, on peut aussi envisager d'utiliser les VLPs selon l'invention à titre d'agent de vaccination à l'encontre des tumeurs induites par les antigènes du soi, en préventif ou en thérapeutique. Parmi, les antigènes associés aux tumeurs, on cite notamment la tyrosinase, la glycoprotéine gp100, la famille des protéines MAGE, le CEA, la protéine ras, mutée ou non, la protéine p53, mutée ou non, Mucl et pSA.

30

Des VLPs selon l'invention pourraient être aussi d'une grande utilité pour délivrer *in vivo* des cytokines ou des molécules accessoires ayant une fonction immunomodulatrice (e.g. reconnaissance cellulaire par les cellules T-helper), dans toutes les applications où ces molécules sont prescrites. Parmi les cytokines, on cite notamment l'interleukine-2 (IL-2), l'IL-4, -5, -7, -10, -12, le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), l'interféron gamma (IFN-gamma) et le TGF- β (tumor growth factor- β). Parmi les molécules accessoires on cite notamment B7.1, B7.2, CD40, CD28 et CIITA.

35

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 8 -

Par exemple, une molécule d'acide nucléique utile aux fins de la présente invention, peut non seulement comporter une région codant pour un antigène d'un agent infectieux ou d'un antigène du soi associé à une tumeur, mais aussi une région codant pour une cytokine, e.g. l'IL-2 ou l'IL-12. Afin de traiter ou de prévenir des infections à papillomavirus, une telle région peut être ajoutée à la molécule d'acide nucléique telle que précédemment envisagée. D'une manière générale ceci peut être aussi mis en oeuvre pour toute autre application vaccinale.

De même, des VLPs selon l'invention dont la molécule d'acide nucléique coderait essentiellement pour au moins une cytokine ou au moins une molécule accessoire, peuvent être utiles en thérapie comme élément de traitement de diverses pathologies telles que les tumeurs ou les maladies auto-immunes ou bien encore pour prévenir un rejet après transplantation.

Enfin des VLPs selon l'invention peuvent être aussi utiles dans le traitement des maladies génétiques. Dans ce cas là, pour encapsidation, on prépare une molécule d'acide nucléique comportant au moins une région codant pour une protéine d'intérêt corrigeant un défaut génétique, telle que le facteur VIII, pour traiter l'hémophilie, la dystrophine pour traiter la dystrophie musculaire de Duchenne (myopathie) ou la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) pour traiter la mucoviscidose.

En conséquence, l'invention a aussi pour objet :

- (i) A titre de médicament, une VLP selon l'invention ;
- (ii) Une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif, au moins une VLP selon l'invention en association avec un diluant ou un support acceptable du point de vue pharmaceutique ;
- (iii) Une composition pharmaceutique comprenant au moins deux VLPs, dans laquelle une première VLP comprend une capsid constituée au moins par tout ou partie de la protéine L1 d'un premier type, tel que le type 16 et dans laquelle une deuxième VLP comprend une capsid constituée au moins par tout ou partie de la protéine L1 d'un deuxième type différent du premier type, tel que le type 18 ;
- (iv) L'usage d'une VLP selon l'invention, dans la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une infection bactérienne ou

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 9 -

virale, d'une tumeur *i.a.* induite par un antigène du soi ou d'une maladie auto-immune ou bien encore, destiné à la prévention d'un rejet de greffe ;

(v) Une méthode de traitement ou de prévention d'une infection bactérienne ou virale, d'une tumeur *i.a.* induite par un antigène du soi ou d'une maladie auto-immune ou bien encore, de prévention d'un rejet de greffe, selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'au moins une VLP selon l'invention à un individu ayant besoin d'un tel traitement ; et

(vi) Une méthode d'expression *in vivo*, permettant de fournir à un mammifère, un peptide, un polypeptide ou une protéine sous une forme physiologiquement active, selon laquelle on administre au mammifère, au moins une VLP selon l'invention dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte une région codant pour ledit peptide ou polypeptide ou pour ladite protéine, placée sous le contrôle d'un promoteur approprié si il s'agit d'une molécule d'ADN.

Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe au moins une VLP avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Des exemples de diluants ou de supports ainsi que des méthodes de formulation sont indiqués dans le Remington's Pharmaceutical Sciences. La formulation pourra dépendre de la voie d'administration ; aérosol, formulation injectable, suppositoires, comprimés, etc.

Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, lorsque cette composition est destinée à cet effet. Il s'agit notamment des voies systémiques *e.g.* voie sous-cutanée, intra-dermique, intra-musculaire ou intra-veineuse, et des voies mucosales *e.g.* voie orale, nasale, pulmonaire ou ano-génitale. Lorsqu'il s'agit de traiter des tumeurs solides, les voies précédemment énoncées restent d'usage et on peut y adjoindre aussi la voie intra-tumorale. Lorsqu'il s'agit de traiter des maladies génétiques, le choix de la voie d'administration dépendra essentiellement de la nature de la maladie ; par exemple on retiendra avantageusement la voie pulmonaire dans le cas de la mucoviscidose (les VLPs étant formulées sous forme d'aérosol) ou la voie intra-veineuse dans le cas de l'hémophilie.

L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 10 -

paramètres, par exemple de l'individu traité ou du mode d'administration. De manière générale, une dose comprend de 1 à 250 µg de VLPs selon l'invention.

5 L'invention se rapporte aussi à un procédé de préparation de VLPs selon l'invention, selon lequel on mélange une molécule d'acide nucléique définie comme précédemment, avec tout ou partie de la protéine L1 d'un papillomavirus sous forme dissociée et de manière optionnelle, tout ou partie de la protéine L2 d'un papillomavirus, en présence d'un agent permettant la réassociation de la protéine L1 (ou des protéines L1 et L2) sous forme de capside, *e.g.* un sel de calcium, et on récupère à
10 partir du mélange, lesdites VLPs.

Lorsque l'ADN destiné à être encapsidé comporte un site qui lui permette de se lier à la protéine E2, il devient avantageux de rajouter cette protéine au mélange de reconstitution. Auparavant cette protéine aura par exemple était produite par voie
15 recombinante, dans un système procaryote (bactéries) ou eucaryote (*i.a.* levures, cellules d'insectes).

Préalablement à l'étape du mélange, il est avantageux d'exprimer tout ou partie de la protéine L1, optionnellement tout ou partie de la protéine L2, par voie recombinante
20 dans une cellule-hôte eucaryote. Dans ce cas, on récupère des pseudo-particules vides, et on les traite par un agent réducteur et/ou par un agent chélateur des ions calcium, pour obtenir tout ou partie de la protéine L1, optionnellement tout ou partie de la protéine L2, sous forme dissociée.

25 De manière avantageuse, tout ou partie de la protéine L₁ optionnellement tout ou partie de la protéine L₂, est exprimée par voie recombinante dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine L₁ optionnellement pour tout ou partie de la protéine L₂, placé sous le contrôle d'un promoteur approprié.

30 Lorsque les VLPs selon l'invention sont utilisées dans des traitements de longue durée, comme par exemple dans le traitement d'un cancer, l'administration répétée d'un même type de VLPs (c'est-à-dire de VLPs ayant la même capside) peut être gênante d'un point de vue immunologique. Afin de surmonter ce désavantage potentiel, on peut
35 prévoir d'utiliser de manière séquentielle, des VLPs ayant des capsides différentes. Par exemple on peut préparer tout une gamme de VLPs ayant la même molécule d'acide nucléique (ayant une région codant *e.g.* pour l'IL-2 ou l'IL-12) mais différant par le type de papillomavirus dont est issue la protéine L1 et, optionnellement la protéine E2. Ainsi

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 11 -

on utilisera de manière consécutive, des VLPs de capside type 16 (une ou plusieurs fois), puis des VLPs de capside type 18 (une ou plusieurs fois), etc.

C'est pourquoi l'invention a aussi pour objet :

5

(i) Une méthode de traitement d'une maladie génétique, d'un état cancéreux, ou d'une infection à papillomavirus selon laquelle on administre au mammifère ayant besoin d'un tel traitement, des VLPs selon l'invention, de manière répétée à t_n , t_{n+1} ; n étant un nombre supérieur ou égal à 1 ; les VLPs administrées à t_{n+1} différant des VLPs administrées à t_n en ce que la protéine L_1 ou les protéines L_1 et L_2 de la capside des VLPs administrées à t_{n+1} , dérive(nt) d'un papillomavirus de type autre que celui dont dérive(nt) la protéine L_1 ou les protéines L_1 et L_2 de la capside des VLPs administrées à t_n ; et

10

(ii) Une composition pharmaceutique qui comprend plusieurs produits pour administration consécutive ; les produits étant chacun constitué de VLPs selon l'invention et différant les uns des autres en ce que la protéine L_1 ou les protéines L_1 et L_2 de la capside des VLPs dérive(nt) pour chaque produit d'un papillomavirus de type différent.

15
20

EXEMPLE

Préparation de VLPs vides

25

Un stock de VLPs de type HPV-16 est préparé à partir d'une culture de cellules Sf-9 infectées par un baculovirus recombinant. Ce baculovirus possède, insérés dans son génome, les fragments d'ADN de HPV-16 codant pour L_1 et L_2 , originellement isolés à partir d'un *condylomata acuminata*. La séquence codant pour L_1 est divulguée dans WO 94/5792. On note en particulier que le codon correspondant à l'acide aminé en position 202 est un codon acide aspartique.

30

La construction du baculovirus, la culture des cellules Sf-9 ainsi que la purification des VLPs sont décrites dans Kirnbauer et al, J. Virol. (1993) 67 : 6929 ou dans Suzich et al, PNAS (1995) 92 : 11553.

35

Dissociation des VLPs

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 12 -

- 5 A 250 µl d'une préparation de VLPs obtenues après dialyse contre du tampon phosphate 1 mM pH 8, on ajoute 250 µl de tampon phosphate 1 mM pH 8 contenant 300 mM NaCl, 2 mM EGTA (ethylene glycol tetracetic acid) et 40 mM DTT (dithiotreitol). On laisse se poursuivre l'incubation à 37°C pendant une heure. La concentration finale en VLPs soumise à dissociation est de l'ordre de 200 µg / ml. Une variante du protocole de dissociation est aussi décrite dans Volpers et al, J. Virol. (1995) 69 : 3258. Cette préparation est ensuite dialysée de manière extensive contre du tampon phosphate 1 mM pH 8.

10 Préparation de l'ADN destiné à être encapsidé

- Le plasmide pnRSV-NP (A/PR/8/34) qui comporte le cDNA codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe A/PR/8/34 sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV), est préparé comme décrit dans Ulmer et al, Science (1993) 259 : 1745.

Encapsidation de l'ADN

- 20 50 ng d'ADN purifié sous un volume de 500 µl sont ajoutés à 500 µl de la préparation de VLPs dissociées obtenues précédemment. Puis on ajoute 25 µl d'une solution de chlorure de calcium 20 mM. On laisse incuber 30 min à 37°C. Le mélange est ensuite soumis à une centrifugation en sucrose 40 % dans un rotor SW28 à 28 000 rpm pendant 20 heures. On récupère une bande à la densité de 1.33 g/ml qui contient l'ADN encapsidé et que l'on dialyse contre du tampon phosphate 1 mM pH 8.
- 25

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 13 -

Revendications

1. Une pseudo-particule virale (VLP) non-infectieuse qui comprend :
 - (i) une capsidite délimitant un espace interne et constituée au moins par tout ou partie de la protéine L₁ d'un papillomavirus, et
 - (ii) une molécule d'acide nucléique contenue dans ledit espace interne ; la molécule d'acide nucléique étant différente du génome d'un papillomavirus au moins en ce qu'elle est dépourvue de tout ou partie des régions dudit génome codant pour les protéines tardives de type sauvage.
2. Une pseudo-particule virale selon la revendication 1, dans laquelle la capsidite est constituée au moins par tout ou partie de la protéine L₁ à l'état de protéine chimère L₁ - E₇.
3. Une pseudo-particule virale selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle la capsidite est constituée au moins par tout ou partie de la protéine L₁ d'un papillomavirus humain (HPV).
4. Une pseudo-particule virale selon la revendication 3, dans laquelle la capsidite est constituée au moins par tout ou partie de la protéine L₁ d'un papillomavirus humain de type 1, 6, 10, 11, 16, 18, 31, 33, 35 ou 45.
5. Une pseudo-particule virale selon la revendication 4, dans laquelle la capsidite est constituée au moins par tout ou partie de la protéine L₁ d'un HPV-16, -18, -31, -33, -35 ou -45 initialement isolé à partir d'une lésion bénigne (condyloma acuminatum ou dysplasie cervicale).
6. Une pseudo-particule virale selon la revendication 5, dans laquelle la capsidite est constituée au moins par tout ou partie de la protéine L₁ d'un HPV-16 ayant une séquence d'acides aminés qui comporte en position 202, un acide aminé autre que l'histidine.
7. Une pseudo-particule virale selon la revendication 6, dans laquelle la capsidite est constituée au moins par tout ou partie de la protéine L₁ d'un HPV-16 ayant une séquence d'acides aminés qui comporte en position 202, un résidu acide aspartique ou acide glutamique.

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 14 -

8. Une pseudo-particule virale selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle la capside est en outre constituée par tout ou partie de la protéine L_2 d'un papillomavirus.
9. Une pseudo-particule virale selon la revendication 8, dans laquelle la capside est en outre constituée par tout ou partie de la protéine L_2 à l'état de chimère $L_2 - E_7$.
10. Une pseudo-particule virale selon l'une des revendications 1 à 9, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte une région codant pour une protéine d'intérêt.
11. Une pseudo-particule virale selon la revendication 10, dans laquelle la molécule d'acide nucléique est de l'ADN et comporte une région codant pour une protéine d'intérêt placée sous le contrôle d'un promoteur capable de promouvoir la transcription dans les cellules de mammifères.
12. Une pseudo-particule virale selon la revendication 11, dans laquelle la molécule d'ADN comporte en outre un site de liaison de la protéine E_2 d'un papillomavirus, de formule $ACCN_6MT$ dans laquelle N est A, G, C ou T et M est G ou T.
13. Une pseudo-particule virale selon la revendication 11, dans laquelle la molécule d'ADN comporte en outre tout ou partie de la longue région de contrôle (LCR) du génome d'un papillomavirus.
14. Une pseudo-particule virale selon l'une des revendications 10 à 13, dans laquelle la molécule d'acide nucléique est d'au plus 8 kbp.
15. Une pseudo-particule virale selon l'une des revendications 10 à 14, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte au moins une région codant pour une protéine d'intérêt sélectionnée parmi les cytokines et les molécules accessoires facilitant la reconnaissance cellulaire par les cellules T helper.
16. Une pseudo-particule virale selon l'une des revendications 10 à 14, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte au moins une région codant pour une protéine d'intérêt sélectionnée parmi les antigènes associés aux tumeurs.

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 15 -

17. Une pseudo-particule virale selon l'une des revendications 10 à 14, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte au moins une région codant pour une protéine d'intérêt sélectionnée parmi les antigènes parasitaires, bactériens ou viraux.
18. Une pseudo-particule virale selon la revendication 17, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte au moins une région codant pour une protéine d'intérêt sélectionnée parmi les protéines E₁ et E₂ et les formes non-oncogéniques des protéines E₆ et E₇ d'un papillomavirus.
19. Une pseudo-particule virale selon la revendication 18, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte au moins une région codant pour une protéine d'intérêt sélectionnée parmi les protéines E₁ et E₂ et les formes non-oncogéniques des protéines E₆ et E₇ d'un papillomavirus de type HPV-16, -18, -31, -33, -35 ou -45.
20. Une pseudo-particule virale selon la revendication 18 ou 19, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte au moins une région codant pour une protéine d'intérêt sélectionnée parmi les protéines E₁ et E₂ et les formes non-oncogéniques des protéines E₆ et E₇ d'un papillomavirus d'un type différent de celui dont est (sont) issue(s) la ou les protéine(s) de capsid.
21. Une pseudo-particule virale selon les revendications 15 et 16, 18, 19 ou 20.
22. Une pseudo-particule virale selon l'une des revendications 10 à 14, dans laquelle la molécule d'acide nucléique comporte au moins une région codant pour une protéine d'intérêt en thérapie des maladies génétiques.
23. A titre de médicament, une pseudo particule virale selon l'une des revendications 1 à 22.
24. Un procédé de préparation de pseudo-particules virales selon l'une des revendications 1 à 22, selon lequel on mélange une molécule d'acide nucléique différente du génome d'un papillomavirus au moins en ce qu'elle est dépourvue de tout ou partie des régions dudit génome codant pour les protéines tardives de type sauvage, avec tout ou partie de la protéine L₁ d'un papillomavirus sous forme dissociée, en présence d'un sel de calcium et on récupère à partir du mélange, lesdites pseudo-particules virales.

WO 97/46693

PCT/FR97/00962

- 16 -

25. Un procédé de préparation selon la revendication 24, selon lequel on mélange en outre tout ou partie de la protéine E₂ d'un papillomavirus à la molécule d'acide nucléique et à la protéine L₁.
26. Un procédé de préparation selon la revendication 25, selon lequel on ajoute au moment du mélange la protéine E₂ d'un papillomavirus déletée de sa partie N - terminale.
27. Un procédé de préparation selon l'une des revendications 24 à 26, selon lequel préalablement à l'étape du mélange,
- (i) on exprime tout ou partie de la protéine L₁, optionnellement tout ou partie de la protéine L₂, par voie recombinante,
 - (ii) on récupère des pseudo-particules vides, et
 - (iii) on traite les pseudo-particules vides par un agent réducteur et/ou par un agent chélateur des ions calcium, pour obtenir tout ou partie de la protéine L₁, optionnellement tout ou partie de la protéine L₂, sous forme dissociée.
28. Un procédé de préparation selon la revendication 27, dans lequel tout ou partie de la protéine L₁, optionnellement tout ou partie de la protéine L₂, est exprimée par voie recombinante dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine L₁, optionnellement pour tout ou partie de la protéine L₂, placé sous le contrôle d'un promoteur approprié.
29. Une composition pharmaceutique qui comprend plusieurs produits pour administration consécutive ; les produits étant chacun constitué de pseudo particules virales selon l'une des revendications 1 à 22 et différant les uns des autres en ce que la protéine L₁, ou les protéines L₁ et L₂ de la capsid des pseudo-particules dérive(nt) pour chaque produit d'un papillomavirus de type différent.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/86 C07K14/025

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y | WO 96 11274 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, DEPT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 18 April 1996 | 1 |
| A | see the whole document | 2-9, 22, 23, 28 |
| Y | DE 43 35 025 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, INGELHEIM DE) 20 April 1995 | 1 |
| | see abstract | |
| | --- | |
| | --- -- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 1997

Date of mailing of the international search report

31. 10. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentean 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No
PCT/FR 97/00962

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | KIRNBAUER R ET AL: "EFFICIENT SELF-ASSEMBLY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 L1 AND L1-L2 INTO VIRUS-LIKE PARTICLES" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 12, December 1993, BALTIMORE, US, pages 6929-6936, XP000196637 cited in the application see the whole document --- | 3-8 |
| A | WO 93 02184 A (UNIVERSITY OF QUEENSLAND (AU); CLS LIMITED (AU)) 4 February 1993 cited in the application see claims 1,4,5 --- | 1,3,4 |
| A | WO 94 20137 A (UNIVERSITY OF ROCHESTER US) 15 September 1994 cited in the application see abstract see figure 8 see claims 1-40 see page 5, line 23 - page 6, line 23 ----- | 3-5,28 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00962

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| WO 9611274 A | 18-04-96 | US 5618536 A AU 3828495 A EP 0789766 A | 08-04-97 02-05-96 20-08-97 |
| DE 4335025 A | 20-04-95 | AU 681705 B AU 7812094 A WO 9510624 A EP 0724643 A JP 9503665 T | 04-09-97 04-05-95 20-04-95 07-08-96 15-04-97 |
| WO 9302184 A | 04-02-93 | AU 651727 B EP 0595935 A JP 7505042 T | 28-07-94 11-05-94 08-06-95 |
| WO 9420137 A | 15-09-94 | AU 6443694 A EP 0688227 A JP 8507685 T | 26-09-94 27-12-95 20-08-96 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Dem = Internationale No
 PCT/FR 97/00962

 A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N15/86 C07K14/025

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Y | WO 96 11274 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, DEPT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 18 avril 1996 | 1 |
| A | voir le document en entier | 2-9, 22, 23, 28 |
| Y | DE 43 35 025 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, INGELHEIM DE) 20 avril 1995 | 1 |
| | voir abrégé | |
| | --- | |
| | --- | |
| | -/-- | |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31. 10. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No

PCT/FR 97/00962

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | KIRNBAUER R ET AL: "EFFICIENT SELF-ASSEMBLY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 L1 AND L1-L2 INTO VIRUS-LIKE PARTICLES" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 12, décembre 1993, BALTIMORE, US, pages 6929-6936, XP000196637 cité dans la demande voir le document en entier ---- | 3-8 |
| A | WO 93 02184 A (UNIVERSITY OF QUEENSLAND (AU); CLS LIMITED (AU)) 4 février 1993 cité dans la demande voir revendications 1,4,5 ---- | 1,3,4 |
| A | WO 94 20137 A (UNIVERSITY OF ROCHESTER US) 15 septembre 1994 cité dans la demande voir abrégé voir figure 8 voir revendications 1-40 voir page 5, ligne 23 - page 6, ligne 23 ----- | 3-5,28 |

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem . Internationale No

PCT/FR 97/00962

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO 9611274 A | 18-04-96 | US 5618536 A | 08-04-97 |
| | | AU 3828495 A | 02-05-96 |
| | | EP 0789766 A | 20-08-97 |
| DE 4335025 A | 20-04-95 | AU 681705 B | 04-09-97 |
| | | AU 7812094 A | 04-05-95 |
| | | WO 9510624 A | 20-04-95 |
| | | EP 0724643 A | 07-08-96 |
| | | JP 9503665 T | 15-04-97 |
| WO 9302184 A | 04-02-93 | AU 651727 B | 28-07-94 |
| | | EP 0595935 A | 11-05-94 |
| | | JP 7505042 T | 08-06-95 |
| WO 9420137 A | 15-09-94 | AU 6443694 A | 26-09-94 |
| | | EP 0688227 A | 27-12-95 |
| | | JP 8507685 T | 20-08-96 |